

発育期ラットにおける筋付着部の骨構造に及ぼす メカニカルストレスの影響

Effects of Mechanical Stress on Bone Structures of Muscle-attaching Portion in Growing Rats

西本 哲也* 高橋 将人* 大迫 正文*

NISHIMOTO Tetsuya TAKAHASHI Masato OHSAKO Masafumi

要旨

本研究は、ラットに跳躍運動を課して、大腿骨遠位骨端における海綿骨の骨梁構造と、腓腹筋起始腱が骨内に埋入されたシャープ線維の構造変化を観察することにより、筋からの牽引力と海綿骨構造との関連性について検討することを目的とした。

材料として、5週齢のウィスター系雄性ラット24匹を用い、それらを無作為に跳躍運動を負荷する運動群（EX）とコントロール（CO）に分類した。EXは1、2、3および4週間の実験期間別にEX1、EX2、EX3およびEX4とし、それらのコントロールも同様に分類した。EXには、高さ45cmの跳躍運動を1日に40回、週に5日間行わせた。実験期間終了後、大腿骨および腓腹筋を摘出して標本を作製し、形態計測学的および組織学的に観察した。

形態計測学的には、EX-3以降で骨量が顕著に増加し、EX-3およびEX-4ではそれぞれのCOより有意に（それぞれ $P < 0.05$ および $P < 0.01$ ）高い値を示した。組織学的には、EX-2および3では、皮質骨が肥厚するとともに、その直下の骨梁が互いに融合し、さらに、EX-4では融合した骨梁が多く存在して、それらが骨端深部の骨梁が板状の構造を成す部分と連続していた。腓腹筋起始腱線維の埋入部では、EXのシャープ線維の縁はCOよりも高く突出していた。EXにおける腓腹筋起始の辺縁部を拡大して観察すると、そこにはシャープ線維が多く存在していたが、その中でも辺縁に位置するものは皮質骨からの突出が弱く、起始の中心部に向かうにしたがって、徐々にシャープ線維の縁の石灰化した部位が高く突出していた。

運動に伴って海綿骨の骨梁は密度を増すが、それらの中には筋付着部から連続するものがみられ、また、筋付着部では腱線維が順次骨基質内に埋入されており、これらのことから、運動によって生じる海綿骨の構造変化に筋からの牽引力が深く関わっていることが理解された。

キーワード：筋付着部 骨構造 運動

*東洋大学ライフデザイン学部健康スポーツ学科 Toyo Univ. Faculty of Human Life design

連絡先：〒351-8510 埼玉県朝霞市岡48-1（東洋大学）

電話：048-468-4461（研究室直通）・ファックス：048-468-6790

はじめに

骨端における海綿骨は、隣接する骨や着地面からの荷重の分散に大きな役割を果たす¹⁾。海綿骨を構成する骨梁の配列方向は、骨に加えられた荷重の力線の方に一致し、そのため個々の骨で骨梁の主たる配列方向が異なる。ヒトの距骨の場合、脛骨側の関節面付近の骨梁はほぼ垂直方向に配列するが、距骨の中でも前方の骨梁は前上方から後下方に向けて配列し、これらは最終的に円弧をなして突出する踵骨の関節面に向けて集束することが示されている²⁾。また、前後方向にS字状の弯曲を示すラット脛骨の近位骨幹端の海綿骨では、骨梁は主として前上方から後下方に向けて配列することが報告されている^{3,4)}。このような海綿骨の骨梁構造は運動によって変化することも示されている⁵⁻⁷⁾。尾淵⁵⁾は、ラットに異なる回数の跳躍運動を2週間課し、回数の増加に伴って骨梁がより顕著に太くなることを報告している。一方、海綿骨の骨梁は短期間の不動によって減少することが示されているが⁶⁾、高橋⁷⁾はラットを用いた短期間不動後の運動実験により、一次海綿骨の構造の回復が早期に見られることを明らかにしている。このようにメカニカルストレスの増減によって海綿骨の構造が変化するが、骨にもたらされるメカニカルストレスは隣接する骨や着地面からのみならず、筋からの牽引力も深く関わる。骨を牽引する腱線維は石灰化し、骨内に埋入されている。ラットを用いた不動実験ではシャープ線維が埋入される範囲が狭くなり、そこから伸びる海綿骨の骨梁の太さと密度が減少することが示されている⁸⁾。しかしながら、運動負荷に伴うシャープ線維と骨梁構造の双方の関係性についてみた報告はない。

本研究は、ラットに跳躍運動を課して、大腿骨遠位骨端における海綿骨の骨梁構造と腓腹筋起始腱が埋入されたシャープ線維の構造変化を観察することにより、筋からの牽引力と海綿骨構造との関連性について検討することを目的とした。

実験方法

実験動物および実験群の分類

材料として、5週齢のウィスター系雄性ラット24匹を用い、それらを以下のように無作為に分類した。

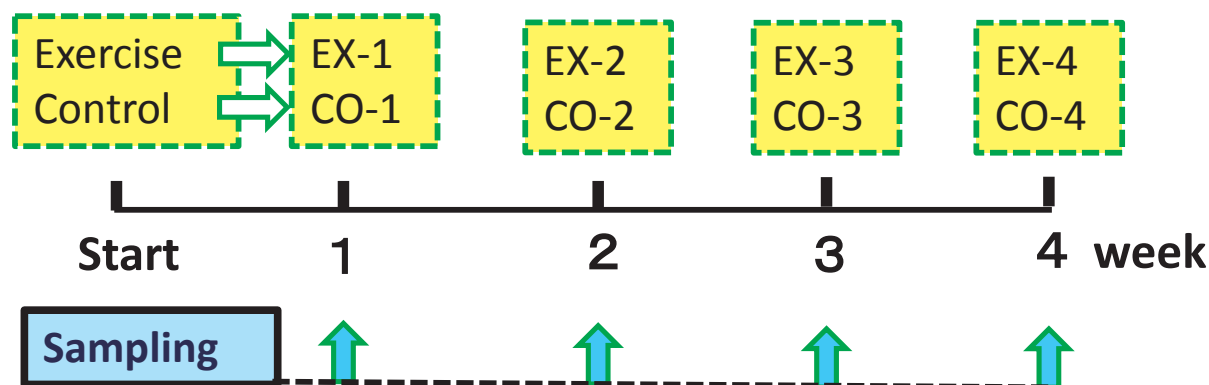


図1. 実験プロトコル

ラットを1日に40回、週に5日の跳躍運動を負荷する運動群 (EX) とコントロール (CO) に分類し、それらは1、2、3および4週間の実験期間別にEX1、EX2、EX3およびEX4とし、それらのコントロールも同様に分類した。各群のラットは搬入後、実験動物飼養室にて2日間の予備飼育を行い、その間にハンドリング等も含め、験者および実験の環境に慣れさせた。(図1)

なお、本実験におけるいずれの群も、給餌給水は自由摂取とし、飼養施設は気温22℃に保ち、また、1日のなかで昼間は明期、夜間は暗期とするように努めた。

運動実験

運動は尾淵ら⁵⁾の方法に従い、高さ45cmの跳躍運動を約1～3秒間の間隔で、一日に40回連続して行わせた。この運動負荷の実験群に関しては、予備飼育期間にあらかじめ跳躍運動の練習を行った。跳躍運動装置の床面には、電気刺激装置が設置されており、予備飼育期間の練習時には、数回の電気刺激を行うことによって、ラットに跳躍の反射運動を獲得させた。そのため、実験期間においては、電気刺激を用いることなく自発的な跳躍運動が可能とされた。

標本の摘出および固定

各群の実験期間終了後、ラットに致死量（通常麻酔量の2～4倍：100～120mg/kg体重）のペントバルビタールNaを投与して、安楽死処置を行った。死亡を確認後、ラット後肢の皮を剥離し、軟組織を極力除去して、大腿骨を摘出した。歯科用ハンドモーターにて、大腿骨の内外的中央部で矢状切断し、速やかに4%パラフォルムアルデヒド、または5%グルタルアルデヒドと4%パラフォルムアルデヒドを含むカルノブスキー液に浸漬し、固定処置を行った。

肉眼および組織学的観察

固定された大腿骨遠位骨端の矢状切断標本を、10%水酸化カリウム溶液 (KOH) に浸漬して有機質を除去し、切断面を実体顕微鏡により観察した。同様な方法にて脱有機質した他の標本を用い、アルコール系列および真空凍結乾燥機にて脱水、乾燥した。さらに、カーボンとプラチナの真空蒸着を施し、走査電子顕微鏡 (SEM) にて一次および二次海綿骨の構造を観察した。

他の固定標本を用いて、パラフィン包埋標本は脱灰の後に包埋して、ブロックを作製した。また、リゴラック樹脂包埋標本は非脱灰のまま包埋した。パラフィン包埋ブロックはマイクロームにて薄切し、厚さ約5ミクロンの完全連続切片を作製し、種々の染色を施して光学顕微鏡により観察した。また、リゴラック樹脂包埋ブロックは、3段階の砥石ならびに、研磨用フィルムを用いて研磨し、厚さ約100ミクロンの研磨標本を作製した。それに1N塩酸による酸エッチングを施した後、トルイジンブルー染色を行って光学顕微鏡により観察した。

骨形態計測

非脱灰リゴラック樹脂包埋標本を研磨し、トルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡により観察し、さらに各群の二次海綿骨の構造を骨形態計測法により測定した。数値データは平均値±標準偏差で表し、群間の平均値における差の統計的な有意性はSPSSソフトを用いて、対応のないMann-

Whitney U testにより検定した。なお、骨形態計測ではBone Volumeの計測を行った。

結 果

1) 体重および筋重量

本実験で用いたCOおよびEXの体重は、実験開始時にはほぼ同様であったが、CO-1は $217.5 \pm 8.29\text{g}$ で、EX-1は $247.5 \pm 23.8\text{g}$ であり、実験開始1週間後から両群の体重にやや差がみられた。その後も両群の体重差は変わらず、EXの方がわずかに大きい値を示した。(図2)

筋重量に関しては、CO-1は $1.36 \pm 0.04\text{g}$ で、EX-1は $1.69 \pm 0.13\text{g}$ であり、実験開始1週間後からすでにEXの筋重量は大きく、その差は3週間後まで継続した。(図3)

2) 海綿骨の形態計測

CO-1のBone Volume は $0.074 \pm 0.04\text{mm}^2$ で、その後CO-4まで徐々に増加した。EX-1は $0.091 \pm 0.037\text{mm}^2$ で、CO-1よりわずかに高い値を示したが、その差は統計的に有意でなかった。EX-3以降で骨量が顕著に増加し、EX-3 ($P < 0.05$) およびEX-4 ($P < 0.01$) ではそれぞれの対象群より有意に高い値を示した。(図4, 5)

3) 海綿骨の組織学的観察

大腿骨遠位骨端を走査電子顕微鏡で拡大して観察すると、CO-1では海綿骨の骨梁が基本的に関節面に対してほぼ直交する方向に配列していた。また、関節面付近を詳細に観察すると、その部位では細く短い骨梁が網状に配列しているのが認められた。それより近位部では骨梁の太さがやや増すが、

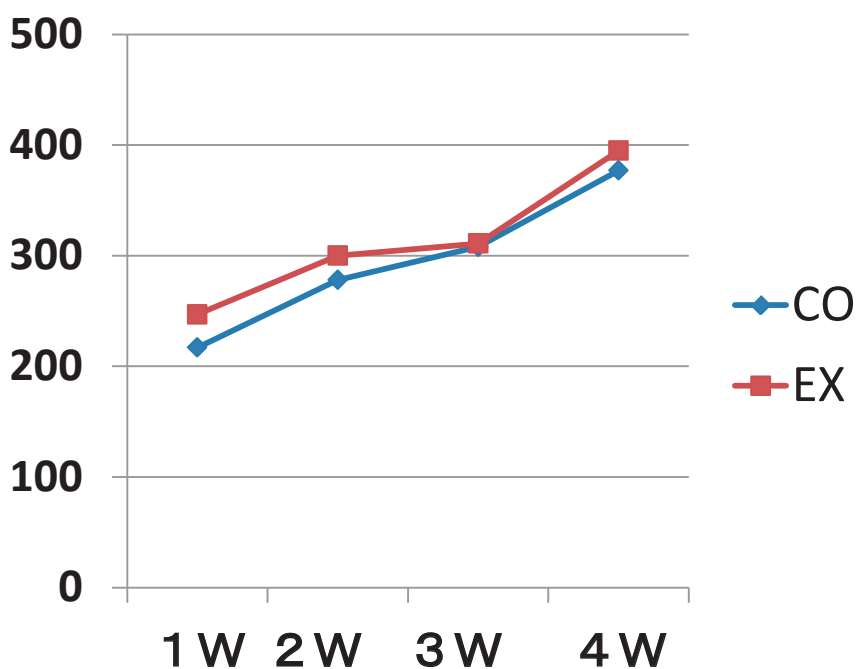


図2. 実験期間中における両群の体重変化

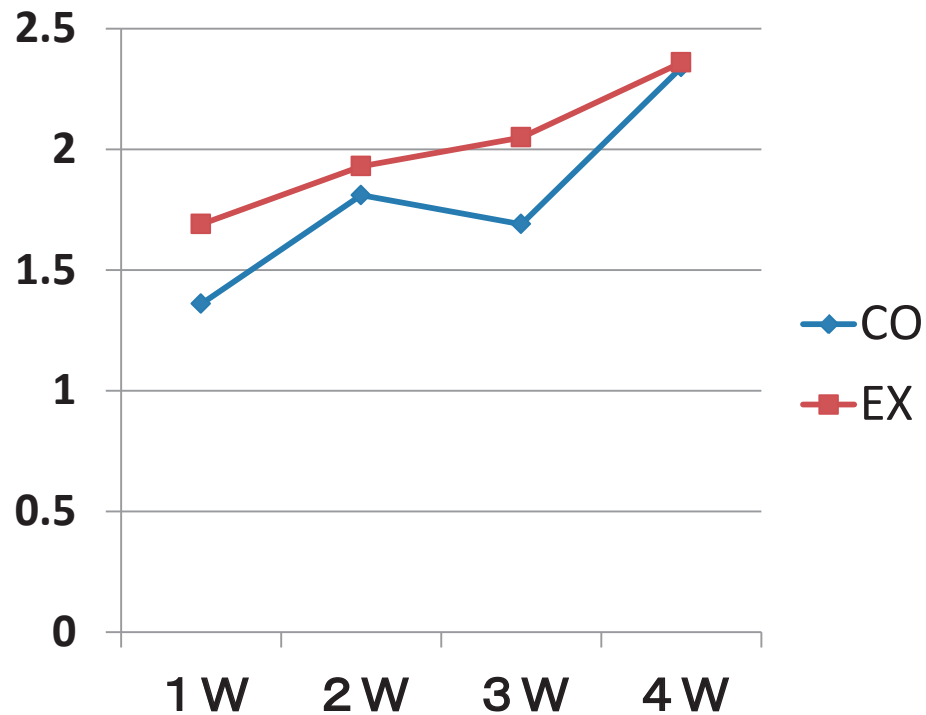


図3. 実験期間中の両群における腓腹筋の重量変化

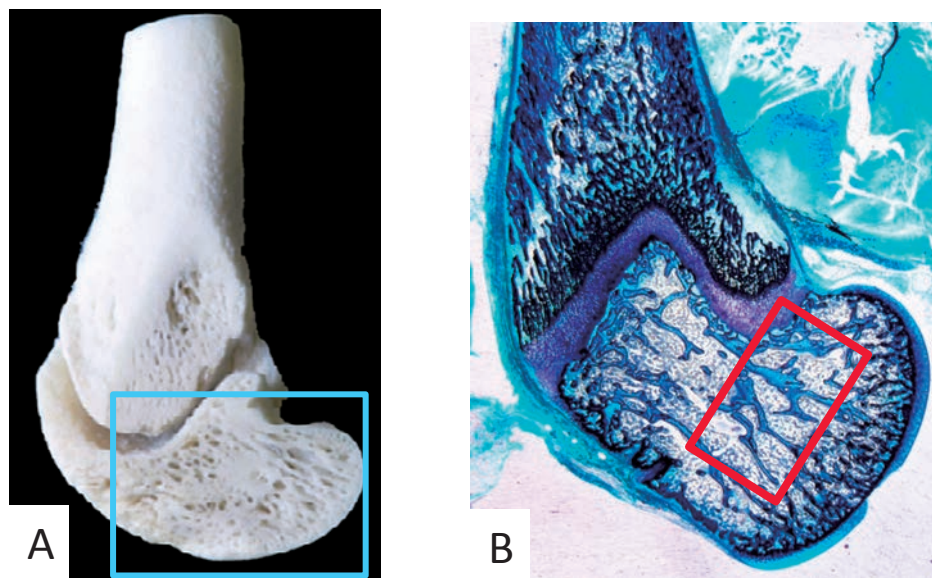


図4. 大腿骨遠位部の海綿骨の構造
A：研磨後、KOHにより処理した乾燥標本, B：リゴラック樹脂包埋研磨標本、トルイジンブルー染色

関節面直下の細い骨梁と同様に網状配列を示した。(図6-A～D)

EXにおいてもEX-1からEX-4に至るまで、関節面直下では細く短い骨梁が網状に配列しており、この点についてはCOと同様であった。しかし、それより関節面から離れた部位では、骨梁は関節面に直交する方向に配列し、それらはCOに比べて太かった。さらに、その深部では骨梁がより太さを増し、隣接するもの同士が互いに融合して、骨端の深部において板状の骨梁を形成している状態もみら

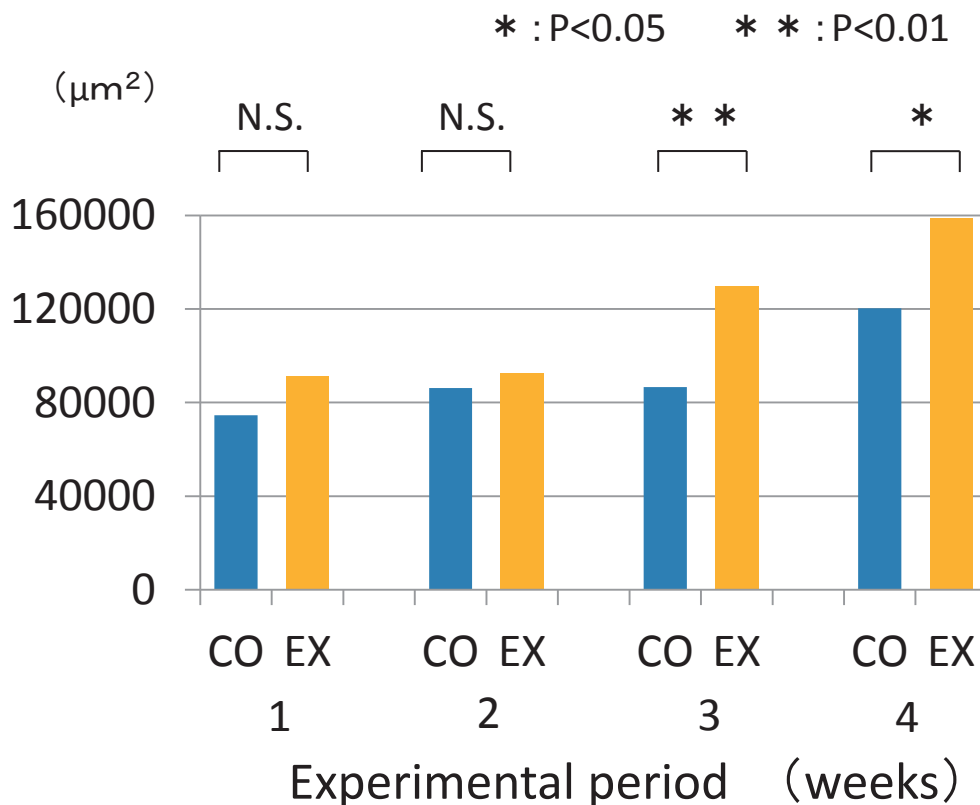


図5. 各群の大腿骨遠位部における海綿骨の骨量計測結果

れた。このようなEXにおける海綿骨の変化はEX-3以降で顕著に認められた。(図6-E~H)

大腿骨骨端の切断面における腓腹筋起始をSEMで拡大して観察すると、COでは皮質骨に平行に配列した複数の骨梁が存在した。それらは短い骨梁で互いに連絡しており、そのような構造はCO-1~4のすべてにおいて観察された。(図7-A~D) また、同様な構造はEXにおいても認められるが、EX-2および3では、皮質骨が肥厚するとともに、その直下の骨梁が互いに融合した。EX-4ではそのような状態がさらに顕著となり、先に述べた骨端深部の板状の骨梁構造を成す部分と連続していた。(図7-E~H)

腓腹筋起始の皮質骨の断面を観察すると、そこにはシャープー線維が密に埋入されていた。(図8-A, B) その部位を皮質骨の表面側から観察すると、骨の基質線維は一定の方向に配列しているが、密に存在するシャープー線維の周囲ではそれを取り巻くように配列した。また、骨髓腔側の基質線維もシャープー線維を取り巻くように配列しているが、全体的に蛇行していた。(図8-C, D)

腓腹筋は大腿骨骨端の背面から起始しており、その部位をSEMで拡大するとその表面は粗造な状態にあった。(図9-A, B) 両群におけるその部位をさらに拡大して観察すると、CO-1および2ではシャープー線維の石灰化した縁が皮質骨表面より突出し、その先端は鋭利であった。しかし、CO-3からCO-4になるにしたがって、その縁の突出はみられなくなり、皮質骨表面は全体的に平滑になっていた。(図10-A~D)

EX-1および2においても、シャープー線維の石灰化した縁には、CO-1および2と同様に突出がみられたが、EX-3および4ではCO-3および4とは異なり、その縁は皮質骨から突出していた。(図10-E~H)

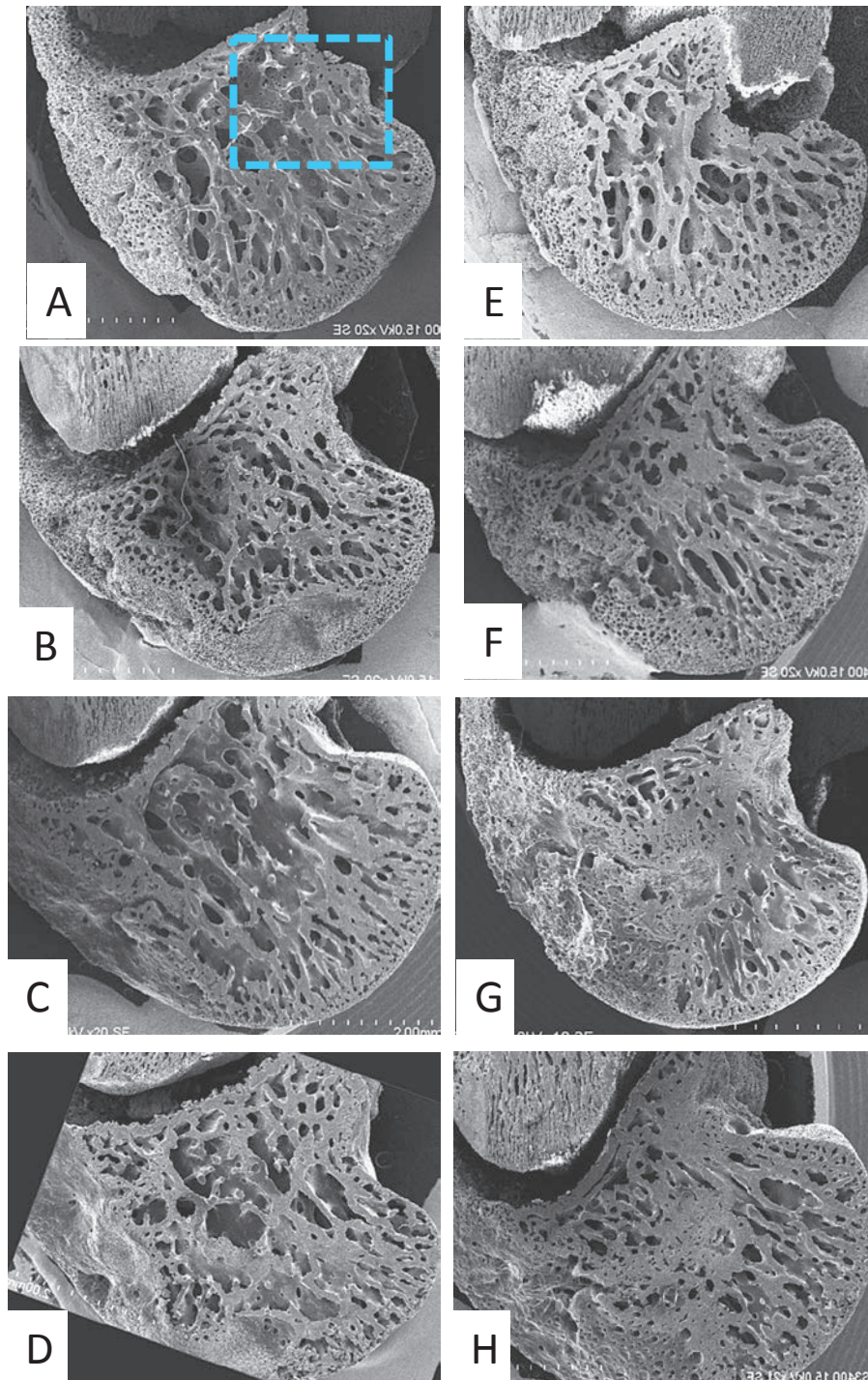


図6．大腿骨遠位部の海綿骨の構造（研磨後、KOHにより処理した乾燥標本のSEM像）
A～D：CO-1～CO-4, E～H：EX-1～EX-4

腓腹筋起始腱の線維の埋入部を観察すると、EXのシャープー線維の縁はCOよりも高く突出していた。（図11-A, B） EXにおける腓腹筋起始の辺縁部を拡大して観察すると、そこにはシャープー線維が多く存在するが、その中でも辺縁に位置するものは皮質骨からの突出が弱く、起始の中央部に向かって徐々にシャープー線維の縁の石灰化した部位が高く突出していた。（図11-C, D）

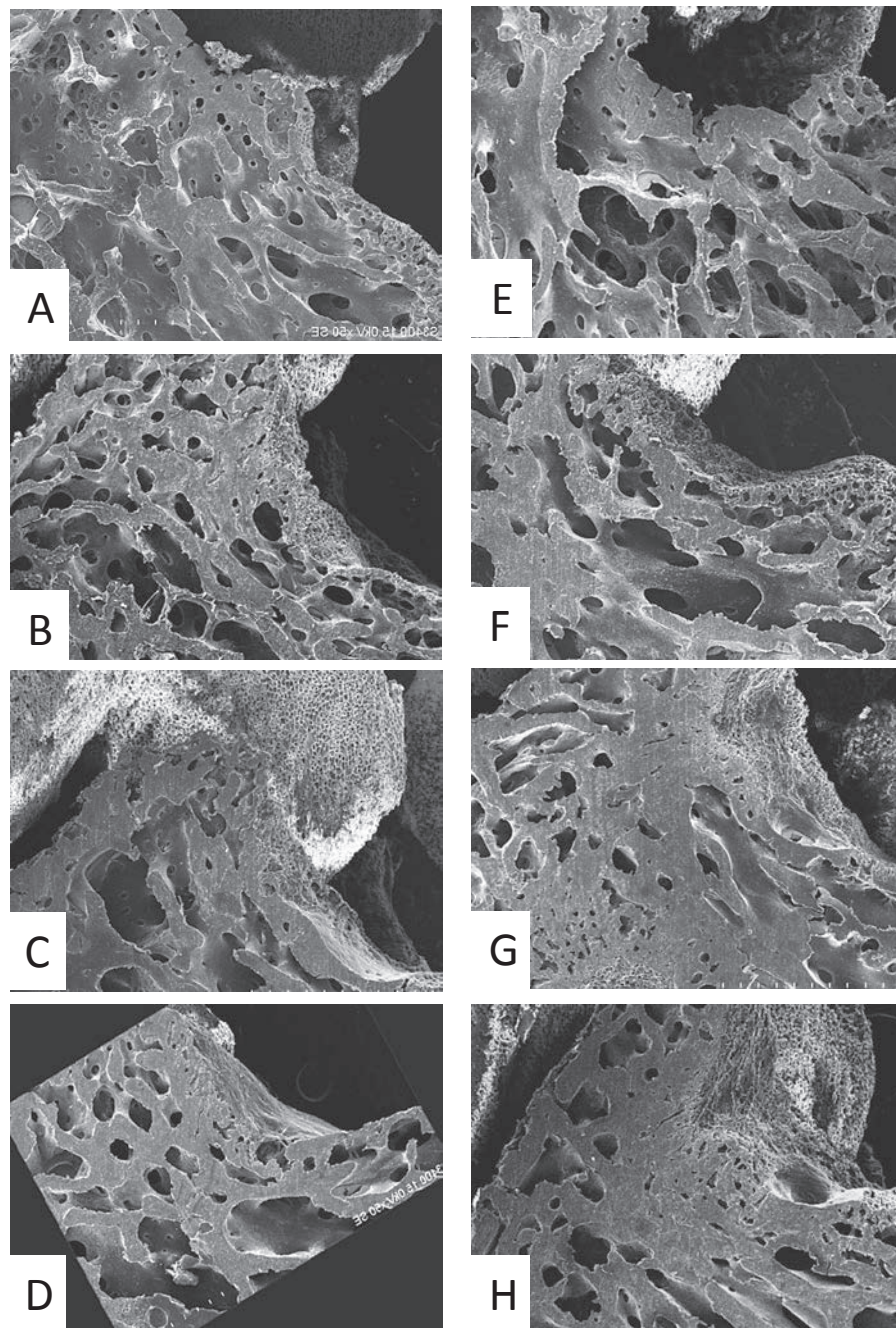


図7 大腿骨遠位部の腓腹筋付着部における海綿骨の構造（研磨後、KOHにより処理した乾燥標本のSEM像）

図6-Aの四角部分で示されるような部位を拡大し各群について示している。

A～D：CO-1～CO-4，E～H：EX-1～EX-4

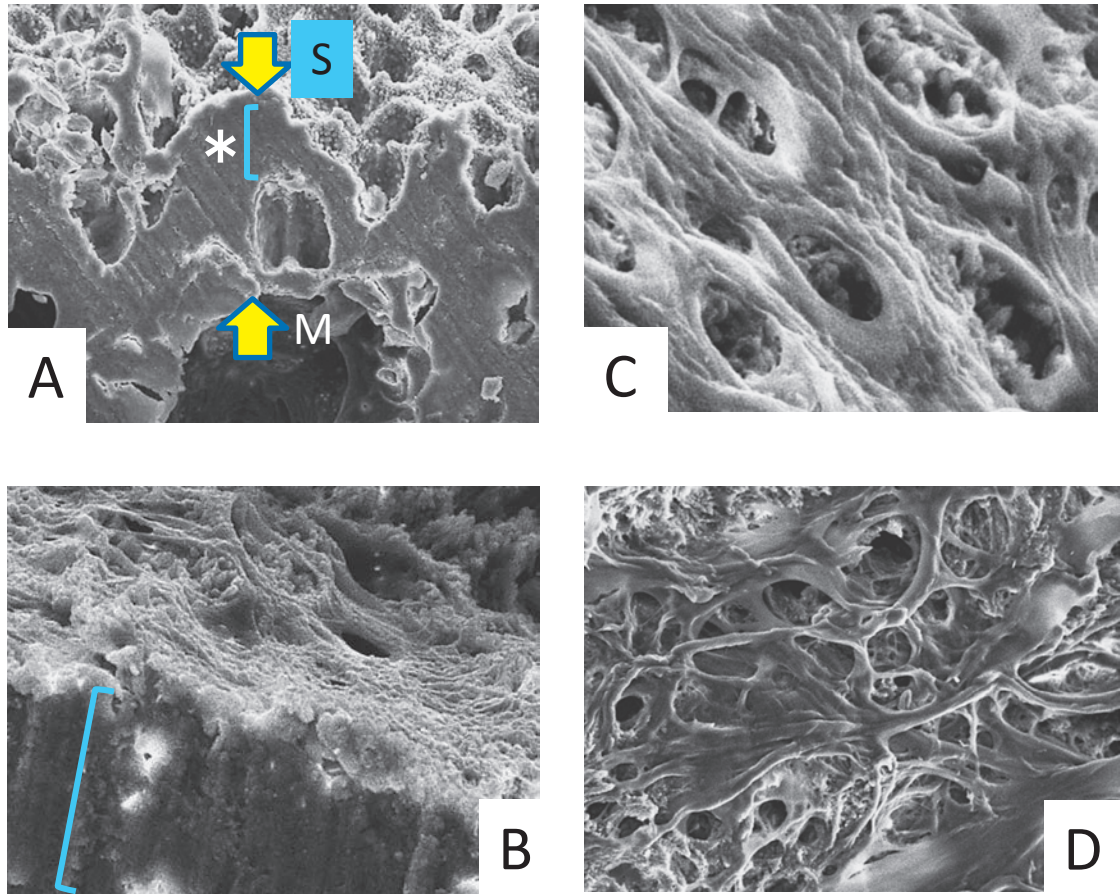


図8. 腓腹筋起始腱が埋入された部位の骨構造（研磨後、KOHにより処理した乾燥標本のSEM像）

A：繊維束骨の断面像、B：図Aの*部分の拡大像、
C：骨の表面側（↓S）から観察した基質線維、
D：骨の骨髓腔側（↑M）から観察した基質線維

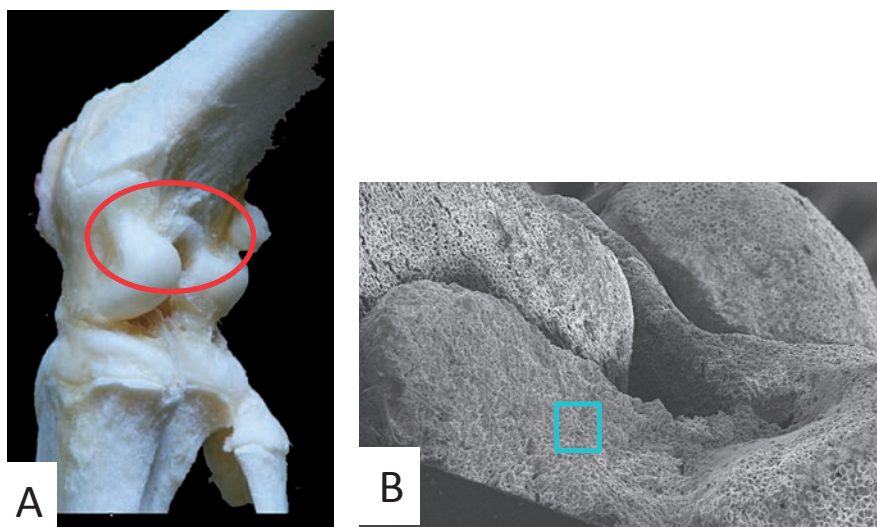


図9. 大腿骨遠位部における腓腹筋付着部位の表面構造（研磨後、KOHにより処理した乾燥標本のSEM像）

A：肉眼観察像、B：図Aの○部分を拡大したSEM像

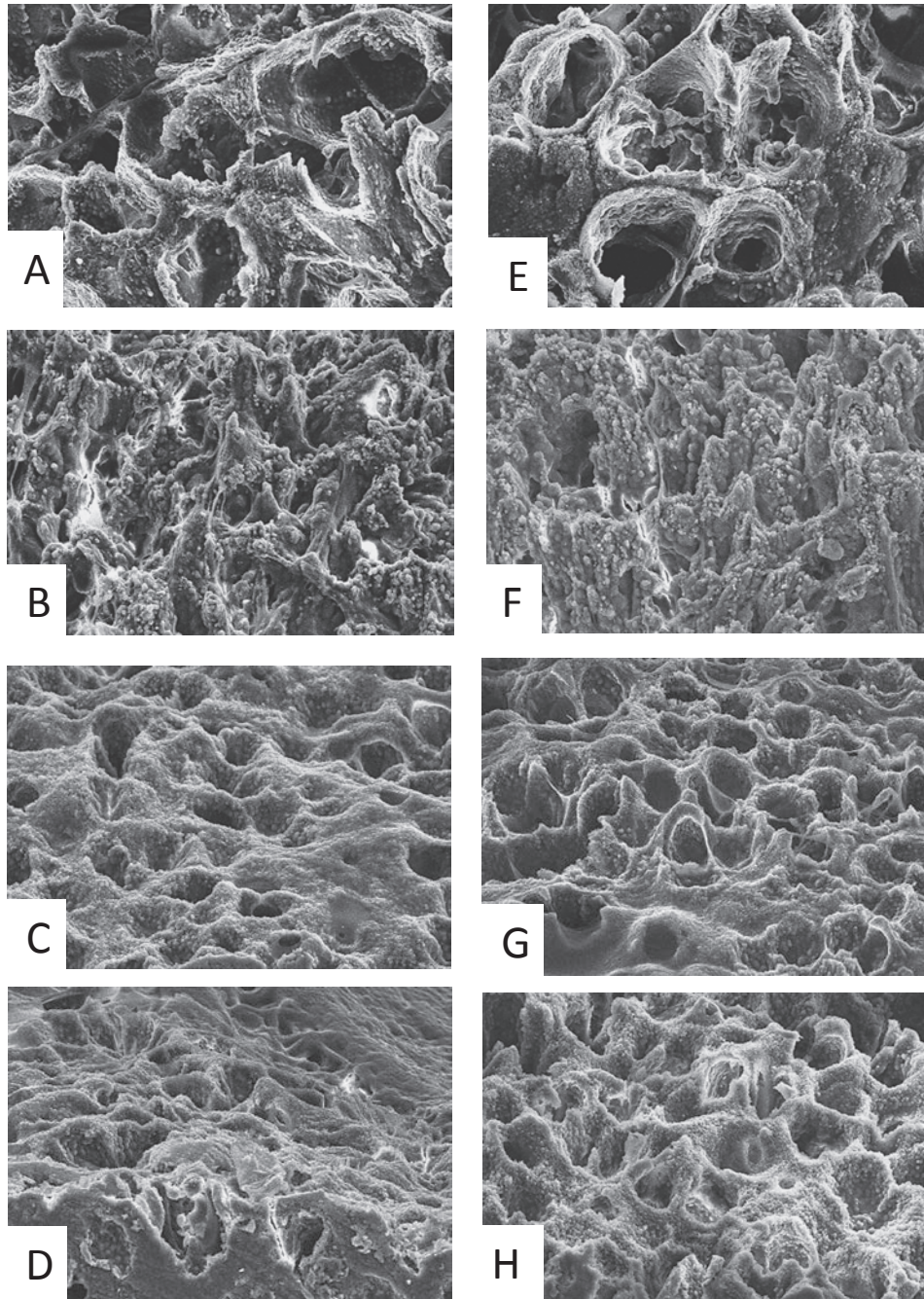


図10. 各群の腓腹筋付着部における骨構造変化（研磨後、KOHにより処理した乾燥標本のSEM像）
A～D：CO-1～CO-4, E～H：EX-1～EX-4

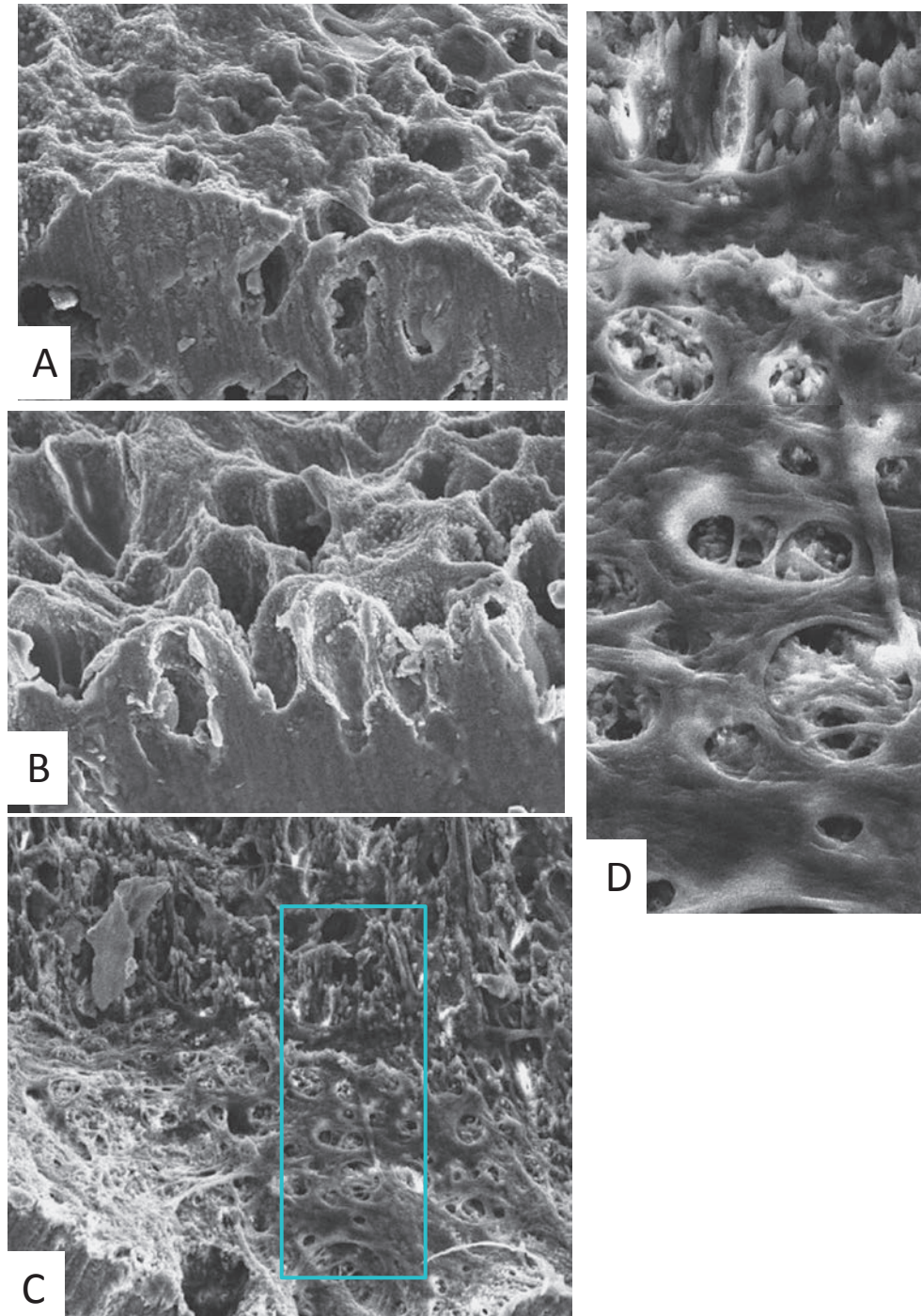


図11. 線維束骨内へのシャーピー線維の埋入過程（研磨後、KOHにより処理した乾燥標本のSEM像）

A：CO-3におけるシャーピー線維辺縁部の構造、B：EX-3におけるシャーピー線維辺縁部の構造、C：EX-3における筋付着部辺縁部の構造、D：図Cの□部分の拡大像

考 察

骨量の増加には、隣接する骨からの荷重のみならず筋からの牽引力も関わる。本研究はそのような観点から、ラットに跳躍運動を課し、腓腹筋起始の骨構造について観察した。その所見をもとに以下に考察を進める。

骨にもたらされた荷重は一点に集中することなく周囲の皮質骨に分散され、そこに海綿骨の骨梁が大きな役割を果たす^{3,4)}。骨梁の太さおよび密度は骨に加えられた荷重の大きさに左右され、また、その配列方向は荷重が骨内で分散される力線の方法に一致する⁹⁾。本実験の観察では、対象群の場合、大腿骨遠位骨端の関節面直下では細くて短い骨梁が網状に配列し、それより離れた部位の骨梁では骨梁の数は減るが太さを増し、それらは関節面に対して直交する方向に配列する。それらの骨梁と関節面との間に存在する網状に配列した細くて短い骨梁は、骨端板直下の一次海綿骨に相当するものであり、これは関節面に加えられた荷重の分散に寄与し、関節面に直交方向に配列した多くの骨梁に荷重を伝達することが可能になっていると考えられる。

椎体内の海綿骨では、骨梁は主として上下方向に配列するものと、それを連結する水平方向の配列を示すものがあり、骨粗鬆症の初期段階では、その水平方向に配列する骨梁から消失するとされている¹⁰⁻¹³⁾。このように椎骨では上下方向に配列する骨梁が、脊柱本来の役割をなし、それらを連結する水平方向の骨梁は上下方向に配列した骨梁を支持している。本実験のEX-2以降で観察された骨端深部の板状の骨梁構造は、椎骨における水平方向の骨梁の働きに相当し、大腿骨骨端における関節面に直交方向に配列した骨梁を支持するとともに、関節面側からのメカニカルストレスを受け止める役割を果たしていると考えられる。

大腿骨骨端断面における腓腹筋起始の皮質骨をSEMで拡大して観察すると、COの場合、皮質骨表面に平行に配列した複数の骨梁が存在し、それらは短い骨梁で互いに連絡している。また、EXにおいてもそのような骨梁構造が認められるが、EX-2および3では、皮質骨が肥厚するとともに、その直下の骨梁が互いに融合している。また、EX-4では融合した骨梁が多く存在し、それらが骨端深部の板状の骨梁構造を成す部分と連続している。このように腓腹筋起始の海綿骨の骨梁が互いに融合することによって、腓腹筋からの牽引力に対する抵抗性を高めていたと思われる。

本実験のEXでは実験期間中に、対象群より筋重量が増加しており、このことからEXでは腓腹筋の筋力も増強したと考えられる。腓腹筋起始の皮質骨直下における海綿骨の骨梁は、運動期間の継続によって前述の骨端深部の緻密な海綿骨の骨梁とも連続するようになる。このような両部位の海綿骨の構造変化は関節面からの荷重を受け止めるのに適していると同時に、増強された筋力によってもたらされる大きな牽引力に対しても抵抗しうる構造となっていると思われる。このように海綿骨は隣接する骨からの荷重のみならず、筋からの牽引力もその構造変化に深く関わることを推測される。

腱の末端は骨内に埋入されることによって、骨が筋収縮の力のよりどころとなって骨を動かすことが可能となる。また、靱帯の末端も骨内に埋入されることによって、安定した関節運動が可能とされている。骨内における腱や靱帯の線維の末端はシャープリー線維と呼ばれ、それは骨の形成時に埋入され、時間の経過とともにその線維も石灰化する¹⁴⁻¹⁷⁾。本実験における腓腹筋起始の皮質骨断面を観察すると、そこにはシャープリー線維が密に埋入され、骨の基質線維がそれを取り巻くように配列して

いる。腱、靱帯ならびに歯根膜にみられるシャープ線維と基質線維の関係と同様に、基質線維がシャープ線維を取り囲み、それらが石灰化することによって、硬組織内におけるシャープ線維の維持が確保されていると思われる。

腓腹筋が起始する大腿骨骨端の背面の表面に見られるシャープ線維の縁の構造は、その線維の石灰化した部位を示している。本実験で観察されたシャープ線維の縁は、実験初期ではいずれの群も皮質骨から突出している。しかし、実験の後半ではCOの縁は平坦となり、EXでは突出している。このようなことを確認するために、皮質骨の切断面でシャープ線維が埋入される部位を見ても、両群の実験2週間後までとEX-3, 4では線維の縁が高く隆起している。

胎児期における歯牙の発生過程では、石灰化速度の違いから象牙質内に板状、球状および鐘状と呼ばれる石灰化パターンが存在し、石灰化速度の速い部位では球状石灰化によって形成がすすめられる¹⁸⁾。本実験で用いた5週齢のラットは発育の旺盛な時期にある。本実験の前半では、両群のシャープ線維の縁は突出していたことから、この時期では、発育に伴う自重や活動量の増加に見合うようにシャープ線維が順次埋入されていたものと考えられる。その後、COで縁が平滑になったのはこの起始におけるシャープ線維の埋入速度が遅くなったためと思われる。一方、EXではEX-4においてもその縁が突出した状態が維持されており、このことから運動負荷に伴って腱線維が順次皮質骨内に埋入され続けていたと考えられる。

本実験における腓腹筋起始の辺縁部に相当する部位を観察すると、EX-3ではその辺縁から中心部に向かうに従って、シャープ線維の縁が順次突出していく過程を確認している。これは起始の辺縁部から中心部に向かってシャープ線維が順次埋入されていく過程を表していると考えられる。また、EXでは運動負荷に伴って、腱線維の末端が順次シャープ線維として骨内に埋入され続けていることを意味するものであろうことが理解される。

結 論

運動に伴って海綿骨の骨梁は密度を増すが、それらの中には筋付着部から連続するものがみられ、また、筋付着部では腱線維が順次骨基質内に埋入されており、これらのことから、運動によって生じる海綿骨の構造変化に筋からの牽引力が深く関わっていることが理解された。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、多くのご協力をいただいた研究室の大学院生および学部生の方々に深謝致します。

本研究の要旨は第68回日本体力医学会大会（於・東京都）において発表した。

倫理審査

本研究の実験は、東洋大学動物実験委員会ならびにライフデザイン学部研究等倫理委員会の承認を得て実施した。

参考文献

- 1) Wolff J.: The law of Bone Remodeling, ed by Crockett J. C.: Bone remodeling at a glance. J. Cell Sci. 1986
- 2) Palg. A., R.V. Routal.: Architecture of the Cancellous Bone of the Human Talus. Anat. Rec. 252: 185-193, 1998.
- 3) 守田 剛、尾淵紀之、大迫正文: 発育に伴うラット脛骨の形態変化ならびにリモデリングに関する研究. ライフデザイン学研究 6: 197-209, 2010.
- 4) 守田剛、滝沢彩音、大迫正文 発育期ラットにおける骨梁構造の特徴に関する研究. 東洋大学大学院紀要, 48: 101-115, 2011.
- 5) 尾淵紀之、守田 剛、大迫正文: ラット脛骨海綿骨の構造に及ぼす異なる強度の運動負荷の影響. ライフデザイン学研究 6: 73-84, 2010.
- 6) 飛田哲也、秋山和歌子、大迫正文: 発育期ラットにおける短期間不動後の運動刺激が骨形成に及ぼす影響. ライフデザイン学研究 8: 161-175, 2012.
- 7) 高橋将人、西本哲也、大迫正文: 発育期ラット脛骨の構造に及ぼす短期間不動の影響. ライフデザイン学研究 7: 257-271, 2011.
- 8) 大迫正文: 筋の萎縮による骨構造の変化に関する研究—「寝たきり」高齢者における筋と骨の脆弱化防止のための基礎的研究として—. 東洋大学紀要教養課程篇 (保健体育) 10: 55-667, 2000.
- 9) Goldstein S.A.: The mechanical properties of trabecular bone: Dependence on anatomic location and function. J. Biomechanics 20: 1055-1061, 1987.
- 10) 岸本英彰: 椎体の骨構造と骨強度—加齢変化と治療による変化. Clinical Calcium 23: 959-966, 2013.
- 11) 吉田成仁、山室隆夫、奥村秀雄、他: 実験的骨粗鬆症ラットの椎体の骨梁変化. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌33: 451-453, 1990.
- 12) 菅原勲、伊勢裕子、盛公江、高橋徹: 骨粗鬆症における骨梁構造の変化—三次元計量・画像再構成による検討. 医学検査52: 200-206, 2003.
- 13) 石田悟: 実験的骨粗鬆症ラットにおける下顎頭の変化に関する研究—大腿骨頭および脊椎骨との比較. 日本口腔外科学会雑誌41: 957-975, 1995.
- 14) 山田一尋: 成長に伴うラット下顎骨咬筋深層付着部の移動様式に関する組織学的研究. 歯科基礎医学会雑誌 27: 254-271, 1985.
- 15) 高橋治、清水典佳、岩沢忠正、他: ラット正中口蓋縫合拡大実験における観察部位、観察方法に関する一考察. 日大口腔科学15: 473-481, 1989.
- 16) 後藤恭徳、江川薫: 緻密骨の基質線維とシャーピー線維の立体微細形態学的研究. 昭和歯学会雑誌14: 133-144, 1994.
- 17) 桑原忠義、若江幸三良、小林俊行、吉田真里、重光俊男、水谷一裕: アキレス腱骨化の3例. 東日本整形災害外科学会雑誌14: 245-248, 2002.
- 18) 網塚憲生: コラーゲン線維の石灰化とその異常—微細構造学的見地から. Kidney Metab. Bone Dis. 22: 185-194, 2009.

Effects of Mechanical Stress on Bone Structures of Muscle-attaching Portion in Growing Rats

NISHIMOTO Tetsuya, TAKAHASHI Masato, OHSAKO Masafumi

Abstract

Purpose of this study was to investigate relationship between traction by muscle and structures of cancellous bone morphologically. Rats were used as materials, and exercise group performed jumping exercise for four weeks. Structural changes in bone trabeculae of the cancellous bone at femur distal epiphysis and origin tendon of gastrocnemius embedded in bone were observed.

The bone trabeculae of the distal epiphysis of femur increased by exercise, and those bone trabecule that connected to muscle-attaching portions also increased remarkably. And, Sharpy's fiber existed more densely at those portions. Then, it was suggested that bone structural changes could be related to drawing force by muscle.

Keywords: Muscle-attaching portion, bone structures, exercise